Aus der Abteilung
Laboratoriumsdiagnostik der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Cytoplasmatischer Androgenrezeptor im ventralen Prostatalappen der Ratte: Wirkung von Cyproteronacetat während der Pubertät

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Susanne Kandel
aus Ulm/Donau

1984

UNIV.
LONDON
COLL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0013

Aus der Abteilung
Laboratoriumsdiagnostik der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Cytoplasmatischer Androgenrezeptor im ventralen Prostatalappen der Ratte: Wirkung von Cyproteronacetat während der Pubertät

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Susanne Kandel
aus Ulm/Donau

1984

Dekan:	Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H. Moeller
2. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Harzmann

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

MEINER MUTTER GEWIDMET

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Doz. Dr.H.Moeller für die Übernahme und Korrektur meiner Dissertation.

Ebenfalls danken möchte ich Frau de Vusser für die Einführung in die Methode und Frau Goecke für ihre freundliche Untersützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei den restlichen Mitarbeiterinnen des Hormonlabors für ihre Geduld und Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1.	Tiere	3
2.2.	Chemikalien	5
2.2.1.	Antiandrogen	5
2.2.2.	Radioaktives Steroid	5
2.2.3.	Nicht radioaktives Hormon	5
2.2.4.	Übrige Substanzen	5
2.3.	Messung der Radioaktivität	6
2.4.	DNA-Bestimmung	6
2.5.	Proteinbestimmung	6
2.6.	Analyse des Steroidrezeptors	7
2.6.1.	Homogenisierung und Fraktionierung	7
2.6.2.	Inkubation	8
2.6.3.	Separierung des markierten Androgenrezeptors	9
2.6.4.	Auswertung der Daten	10
3.	ERGEBNISSE	13
3.1.	Primäre Daten	13
3.2.	Abgeleitete Ergebnisse	18
3.2.1	Bestimmung der Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata	18
3.2.2.	Bestimmung der Rezeptorbindungsstellen pro Prostata	20
3.2.3.	Bestimmung der Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA	22
3.2.4.	Bestimmung der Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein	24
3.2.5.	Mittelwert und Standardabweichungen/2p-Werte	27
4.	DISKUSSION	41
4.1.	Quantitative Bestimmung des Androgenrezeptors	41
4.1.1.	Markierung mit 3H-DHT in vitro	41
4.1.2.	Inkubationszeit und -temperatur	41
4.1.3.	Trennung mittels Agarelektrophorese	42

Seite

4.1.4. Supprimierung der spezifischen Bindung 42
4.1.5. Proteinbestimmung 43
4.1.6. DNA-Bestimmung 44
4.2. Ergebnisse 44
4.2.1. Rezeptorbindungsstellen der Kontrolltiere 44
4.2.2. Rezeptorbindungsstellen der behandelten Tiere 47

5. ZUSAMMENFASSUNG 50

6. LITERATURVERZEICHNIS 52

ABKÜRZUNGEN

Neben den international gebräuchlichen Einheiten und Abkürzungen wurden von mir folgende Kürzel und Zeichen verwendet.

Abb.	Abbildung
CA	Cyproteronacetat (Androcur)
cpm	counts per minute
d	Alterstage
DHT	Dihydrotestosteron
3H-DHT	radioaktiv markiertes Dihydrotestostreon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dR	Desoxyribose
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
$\bar{g}$	Durchschnittsgewicht
LH	Luteinisierendes Hormon
NAD-ase	NAD^+-Nucleosidase (from N. crassa)
N_2	Stickstoff
p	mit CA behandelte Gruppen
pellet	Bodensatz nach dem Zentrifugieren
pk	Kontrollgruppen, unbehandelte Gruppen
R	Ribose
rpm	rounds per minute
R 1881	Methyltrienolon
s	Standardabweichung
s.c.	subcutan
SH-Gruppe	Sulfid Gruppe
SHBG	Sexualhormon bindendes Hormon
Stlsg.	Stammlösung
T	Testosteron
VT	Volumenteil
$\bar{x}$	Mittelwert

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Wirkung der Hormone wird durch Rezeptoren vermittelt: Eiweiße, die die Fähigkeit besitzen, das Hormon spezifisch zu binden und danach typische chemische Reaktionen in der Zelle auszulösen (Karlson, 1979). Die Rezeptoren für die Steroidhormone sind im Cytosol lokalisiert.

Der Androgenrezeptor wurde im ventralen Lappen der Rattenprostata gefunden (Fang et. al. (1969); Mainwaring (1969); Unhjem u. Tveter (1969)). Er ist ein saures Glycoprotein, das in vitro äußerst wärmeempfindlich ist. Es wird vermutet, daß das aktive Molekül phosphoryliert ist. (Gaubert et. al. (1980)).

Die Affinität von DHT zum Rezeptor wird von keinem natürlichen Steroid übertroffen. Die Konzentration des Rezeptors ist niedrig. In der Rattenprostata wird die durchschnittliche Bindungskapazität mit 10 - 150 fmol/mg lösliches Protein angegeben (Zusammenfassung bei Moeller (1982)). Etwa 80% der Androgenrezeptoren einer Zelle sind im Kern lokalisiert und weitgehend mit DHT abgesättigt (Blondeau et. al. (1975)).

Cyproteronacetat wirkt gegenüber DHT als Antiandrogen. Dorfman (1970) definierte den Begriff Antiandrogen folgendermaßen:
"Antiandrogene sind Substanzen, die die Androgene daran hindern, ihre Aktivität an den Zielzellen zu entfalten.
Die hemmende Wirkung dieser Substanzen muß unterschieden werden von Verbindungen, die die Synthese und/oder Freisetzung von Hypothalamus- (releasing factors) und Hypophysenvorderlappen-Hormonen (LH, Gonadotropinen) erniedrigen und von Substanzen, die direkt an den Gonaden die Biosynthese und/oder Androgensekretion hemmen."

Das Antiandrogen Cyproteronacetat wurde in den 60er Jahren ursprünglich als oral wirksames Kontrazeptivum entwickelt (Neumann et.al.(1979)). Chemisch stellt es ein Hydroxyprogesteronderivat dar. CA wurde schwangeren Ratten verabreicht, wobei sich zeigte, daß bei männlichen Foeten die Geschlechtsdifferenzierung gestört wird, so daß sich intersexuelle

Geschöpfe entwickelten. Die weiblichen Foeten blieben davon unberührt.

Daraus schloß man, daß die Wirkung der Androgene durch CA gestört wird (Junkmann u. Neumann (1964); Neumann et. al. (1965)).

Cyproteronacetat wirkt auf alle Organe, Organsysteme und Körperfunktionen, die von Androgenen beeinflußt werden, indem es, wie man allgemein annimmt, die Androgene kompetitiv von dem Rezeptor verdrängt. Außerdem supprimiert es die Sekretion der Gonadotropine.
Cyproteronacetat wird unter dem Handelsnamen Androcur (Schering, Berlin) als Therapeutikum in verschiedenen medizinischen Fachbereichen eingesetzt: in der Urologie, der Psychiatrie, der Pädiatrie, der Gynäkologie und in der Dermatologie, d.h. überall dort, wo bestimmte von Androgenen hervorgerufene Funktionen unterdrückt oder vermindert werden sollten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Konzentrationsveränderungen des cytoplasmatischen Androgenrezeptors im ventralen Lappen der Rattenprostata unter Gabe von Cyproteronacetat s.c. darzustellen.

Es handelt sich hierbei um eine kurzzeitige Studie, die sich vom 30. bis zum 45. Alterstag erstreckt. Die Abstände zwischen den Einzelmessungen betrug genau 5 Tage.

Die Untersuchungen an Ratten lassen zwar nur bedingt direkte Schlüsse auf den Menschen zu, dienen aber doch für ein besseres Verständnis der Regulationsvorgänge im Menschen.
Es ist das Ziel dieser Tierversuche, Erkenntnisse über die Wirkungsweise des Cyproteronacetats und dessen Einflußnahme auf den Androgenrezeptor zu erlangen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiere

Die Tiere stammten von der Tierzucht Ivanovas, Kisslegg/Allgäu. Es handelte sich um männliche Auszuchtratten des Stammes Wistar. Verwendet wurden 4 verschiedene Altersgruppen mit je 4 Untergruppen.

Angeliefert wurden die Tiere jeweils 3 Tage vor Versuchsbeginn, damit sie sich eingewöhnen konnten. Gehalten wurden sie in einem vollklimatisierten Tierstall bei 12 Std. Licht und 12 Std. Dunkelheit, bei Trockenfutter (Altromin) und Wasser ad libitum.

Die Altersgruppen wurden in je 4 Untersuchungsgruppen unterteilt, wobei je nach Alter eine verschiedene Tierzahl verwendet wurde. Für die Einzelversuche wurden jeweils so viele Ratten verwendet, daß pro Gruppe zumindest ein Prostatagesamtgewicht von 300 mg vorhanden war.

1. 30 Tage-Tiere: 4 Gruppen á 18 Tiere
   a) 1 Kontrollgruppe
   b) 3 Gruppen, die mit Hormon behandelt wurden

2. 35 Tage-Tiere: 4 Gruppen á 16 Tiere
   a) 1 Kontrollgruppe
   b) 3 Gruppen, die mit Hormon behandelt wurden

3. 40 Tage-Tiere: 4 Gruppen á 12 Tiere
   a) 1 Kontrollgruppe
   b) 3 Gruppen, die mit Hormon behandelt wurden

4. 45 Tage-Tiere: 4 Gruppen á 10 Tiere
   a) 1 Kontrollgruppe
   b) 3 Gruppen, die mit Hormon behandelt wurden

Insgesamt wurden für alle Versuche 224 Ratten benötigt.

Die Tiere waren beim Versuchseintritt 25, 30, 35 bzw. 40 Tage alt. Die einzelnen Ratten wurden jeweils vor Beginn der Hormonbehandlung und kurz vor der Dekapitation gewogen, wobei sich im Körpergewicht kein signifikanter Unterschied feststellen ließ.
Abgesehen von den Kontrolltieren wurden alle Tiere an 4 aufeinanderfolgenden Tagen zwischen 13.00 und 13.30 Uhr mit 0,1 ml Androcur subkutan gespritzt.
Am 5. Tage wurden die Tiere dann durch Dekapitation getötet, das Blut wurde gesammelt, zentrifugiert und das gewonnene Plasma abpipettiert und bei - 10° C zur späteren Bestimmung des Testosterongehaltes eingefroren.
Anschließend wurde die Prostata, freipräpariert von Bindegewebe und Fett, entnommen und in vorher abgewogenen Teflonkapseln (Schüttelbehälter, Braun Melsungen) gelagert. Die Kapseln wurden stets in flüssigem N_2 vorgekühlt und dann bei - 70° C tiefgefroren.

Hormonverdünnung:

Da Tiere verschiedener Gewichtsgruppen jeweils dasselbe Volumen (0,1 ml) Hormonlösung erhielten, mußte die Konzentration der Hormonlösung variiert werden, damit die Dosis des Hormons bezogen auf das Körpergewicht gleich war.

Cyproteronacetat ≙ Androcur

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 2 Ampullen (à 3 ml ölige Lösung) Androcur und 54 ml Sesamöl verwendet.
Die Stammlösung enthielt dann 10 mg/ml. Diese Stammlösung wurde dann mit Oleum sesami (Mainland Pharmazeutische Fabrik GmbH., Frankfurt) nach folgender Formel verdünnt:

$$1{,}0 \text{ ml Stlsg. x } \frac{100 \text{ ml}}{g}$$

Das Injektionsvolumen enthielt somit 10 mg/kg Körpergewicht.

2.2. Chemikalien

Die zu den Versuchen verwendeten Chemikalien, die von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) stammten, hatten den Reinheitsgrad "pro analysi".

2.2.1. Antiandrogen

Cyproteronacetat ≙ Androcur
Firma Schering, Berlin/Bergkamen
3 ml ölige Injektionslösung enthielten 300 mg Cyproteronacetat.

2.2.2. Radioaktives Steroid

5α - Dihydrotestosteron NET 302 0,25 mCi 40 Ci/mmol
(1,2 - 3H(N))-(5α - Androstan - 17β - ol - 3 - one)

Fa. New England Nuclear Corp.

Die Substanz lag in einer Benzol-Äthanol-Lösung vor (9:1 Vol:Vol). Dieses Gemisch wurde eingedampft und mit reinem Äthanol wieder gelöst. Aus der Stammlösung wurde dann die endgültige Arbeitslösung verdünnt:

10 µl ≙ 157 800 cpm

2.2.3. Nicht radioaktives Hormon

Methyltrienolon ≙ R 1881

New England Nuclear Corp.

2.2.4. Übrige Substanzen

1.NAD-ase (from N. Crassa, Aktivität 0,86 JU/mg Protein; enthalten pro vial 2 mg)

Fa. Sigma (München)

2.Zur Herstellung des Michaelispuffer 0,05 M

- 5,5 Diethylbarbitursäure Natriumsalz	44,6 g/5l
- Natriumacetat	29,4 g/5l
- Na N_3	0,7 g/5l
- 1n HCl	60 ml/5l

Einstellung mit HCl conc. auf pH 8,2 bei 4° C

3. Zur Herstellung des Trispuffer 0,01 M

- 0,01 m Tris (Tris-Hydroxymethylaminomethan) 6,06 g/5l
- 0,005 m NaN_3 1,63 g/5l

mit 25%iger HCl bei 4° C auf pH 7,5 eingestellt.

4. Agar-Platten

- 1,1 g Agar purum)
- 0,12 g Agarose L) Behringwerke AG (Marburg)
- 68 ml Michaelispuffer (0,05 M)
- 67 ml H_2O dest.

2.3. Messung der Radioaktivität

Die ß-Aktivität wurde mit dem Gerät Betaszint BF 5 003 A (Berthold, Bad Wildbad) mit 60% Zählausbeute ausgezählt mit einem Untergrund von 16 cpm.
Für die Proben wurde Unisolve I (Zinsser Analytik, Frankfurt) als Szintillationsflüssigkeit verwendet.

2.4. DNA-Bestimmung

DNA wurde nach der Methode von Burton (1956) bestimmt, wobei jedoch als Standard Desoxyribose verwendet wurde.

2.5. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode von Schaffner und Weissmann (1973) verwendet, die von Moeller (1982) abgewandelt wurde.

Jeweils 2 x 5 µl der Proben wurden auf eine Zellulose-Acetat-Folie (Membranfolie, Katalog-Nr. 11 200, Sartorius, Göttingen) pipettiert, bei Zimmertemperatur getrocknet und bis zur Analyse gelagert.
Die Membranen wurden 10 Min. in Färbelösung inkubiert (1g Amidoschwarz 10 B, 450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 450 ml H_2O), dann 3 x 3 Min. mit Entfärbelösung gewaschen (900 ml Methanol, 20 ml Essigsäure, 80 ml H_2O).
Die noch gefärbten Proteinflecken wurden ausgeschnitten und in einem gläsernen Reagenzglas mit je 1 ml "Verreißlösung"

aufgelöst (100 g Trichloressigsäure, 800 ml Ameisensäure, 100 ml Essigsäure). Die Extinktion wurde bei 620 nm gemessen. Als Standard diente Serumalbumin vom Rind (trocken, reinst, Behring, Batch A 1003). Die Standardkurve ergab im Bereich von 0 - 20 µg einen lienaren Verlauf.

2.6. Analyse des Steroidrezeptors

2.6.1 Homogenisierung und Fraktionierung

Die Analyse des markierten Steroidrezeptors wurde nach der Methode von Wagner (1972, 1978), die von Moeller et. al. (1980, 1983) modifiziert wurde, bestimmt.

Die Prostaten in den Teflonkapseln wurden mittels des Mikrodismembranators (Braun, Melsungen, Melsungen) homogenisiert. Die Kapseln enthielten eine Wolfram-Karbid-Kugel von 10 mm Durchmesser. Sie wurden nochmals auf die Temperatur des flüssigen N_2 gekühlt, dann in die Schüttelvorrichtung eingespannt und drei Mal 30 Sec. mit einer Frequenz von 50 Hz kräftig geschüttelt, jeweils unterbrochen durch erneute Kühlung in flüssigem N_2. So konnte das Gewebe ohne Erwärmung über 0° C zu feinem Pulver homogenisiert werden.
Es wurde noch in tiefgefrorenem Zustand in den Kapseln gewogen und dann bei 0 - 4° C unter Zusatz von 4 Volumenteilen DST-Puffer pro Gewichtsteil aufgetaut, wobei in den 4 VT DST vorher NAD-ase gelöst wurde, um zu verhindern, daß aus ^{3}H-DHT ^{3}H-Androstandiol als Stoffwechselprodukt entsteht. (Moeller et. al. 1980, Moeller 1982, Moeller et. al. 1983).

DST-Puffer

Dithioerythrit	0,050 M
Saccharose	0,250 M
NaN_3	0,005 M
Tris- (hydroxymethyl) amino-methan	0,010 M

bei 4° C mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Das so aufgetaute Gewebepulver wurde in dem DST-Puffer suspendiert, in dem der Kapselinhalt 10 Mal über einen aufgesetzten, 6 cm langen Schlauch in eine Plastikspritze gesogen und wieder zurückgedrückt wurde.
Dabei mußte beachtet werden, die Spritzen nicht mit den Fingern zu erwärmen und Blasenbildung weitgehendst zu verhindern.
Bearbeitet wurde das Gewebe im Kühlraum bei 4°C, wobei alles zum Versuch verwendete Material über Nacht dort gelagert wurde.

Die Suspension wurde 1 Std. bei 100 000 g (40 000 rpm im Rotor 50 TI, Ultrazentrifuge Spinco L 2/65 B, Beckmann Instruments, München) zentrifugiert.
Nach dem einstündigen Zentrifugieren erhielt man im Zentrifugenröhrchen auf dem Grund den Pellet, darüber das Cytosol und die Lipidschicht. Das Cytosol wurde mittels einer Lumbalkanüle vorsichtig entnommen und die Lipidschicht verworfen. Der Pellet wurde belassen zur späteren Bestimmung der DNA.
Anschließend entnahm man 2 x 5 µl Cytosol zur Proteinbestimmung und 4 x 50 µl Cytosol zur Analyse des Androgenrezeptors.

2.6.2. Inkubation (Kurzzeit- u. Langzeitinkubation)

Das hierfür benötigte Cytosol aus dem ventralen Prostatalappen wurde,wie in 2.6.1. beschrieben, gewonnen.
Die Androgenrezeptoren wurden in den 2 folgenden Parallelansätzen markiert:

	Ansatz 1	Ansatz 2
$2{,}89 \times 10^{-7}$ M ^{3}H -DHT in Tris-Puffer	20 µl	20 µl
Tris	20 µl	-
4×10^{-5} M R 1881 in Tris-Puffer	-	20 µl
Cytosol	200 µl	200 µl
DST-Puffer	160 µl	160 µl
	400 µl	400 µl

Ansatz 1 wurde als "heißer" Ansatz, Ansatz 2 als "supprimierter" Ansatz bezeichnet.

Nach 1 Std. Inkubation bei 0 - 4° C wurden jeweils 50 µl der Ansätze mit Hilfe der Agarelektrophorese weiter verarbeitet und die Radioaktivität in den Fraktionen gemessen.
Die 1 h - Inkubation gibt die Menge des freien Rezeptors an (Moeller 1982).

Nach 24 Std. Inkubation, wobei genau wie bei der 1h - Inkubation verfahren wurde, erhält man die Gesamtrezeptormenge (Moeller 1982).

2.6.3. Separierung des markierten Androgenrezeptors

Der radioaktiv markierte Androgenrezeptor wurde mit Hilfe der Agarelektrophorese von ungebundenen radioaktiven Hormonen getrennt und von solchen, die an Moleküle mit anderer elektrophoretischer Beweglichkeit gebunden waren (Elektrophoresegerät bei Wagner (1978) beschrieben).
Die Gießform für die Gelplatten, die Stanze für die Startlöcher, die Elektrophoresekammer mit Kühlblock und der Gelschneideapparat wurden von der Fa. Hölzel/Dorfen) bezogen.

Die Agarplatten wurden 24 h vor Gebrauch hergestellt und im Kühlraum bei 4° C gelagert. Sie wurden auf Glasplatten (100 x 85 x 0,7 mm) in 5 mm Dicke gegossen.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden in der Mittellinie parallel zu der kleineren Kantenlänge 10 Startlöcher (Ø 3,6 mm, Abstand 9 mm) zur Aufnahme der Proben gestanzt. Das elektrische Feld wurde senkrecht zur Reihe der Startlöcher angelegt. Als Elektrodenpuffer diente 0,1 M Michaelispuffer (0,04 M Natriumäthylbarbiturat, 0,06 M Natriumacetat, 0,06 M Na N_3).
Filterpapier diente als Ionenbrücke.
Der Strom wurde konstant auf 90 mA pro Agarplatte gehalten (Netzanschlußgerät 121 280, DESAGA Heidelberg), die Elektro-

phorese dauerte 2 Stunden, die Temperatur des Agargels blieb durch Kühlung des Kühlblocks mit - 6° C kaltem Isopropanol zwischen 3 und 5° C.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in 10 Längsbahnen parallel zur Feldrichtung und dann in 26 Fraktionen von 3 mm Breite senkrecht zur Feldrichtung geschnitten, so daß sich dann 10 Bahnen mit je 26 Fraktionen ergaben. Die überstehenden Ränder wurden verworfen. Auf der anodischen Seite beginnend, wurden die Fraktionen fortlaufend durchnummeriert, so daß das Startloch jeder Bahn auf der Grenze zwischen Fraktion 13 und 14 lag.

Pro Bahn wurden 50 µl Cytosol verwendet. Beschickt wurden jeweils die 2. und 4. Bahn (supprimierter und heißer Ansatz). Nach Beendigung des Laufes wurden die Gelstücke getrennt in Betazählgefäße (Volumen 20 ml, Zinsser) gegeben und mit 10 ml Unisolve I versetzt. Wobei aber die Gefäße 24 Std. stehen mußten bis zur Zählung, damit die Flüssigkeit in das Gel aufgenommen werden konnte.

2.6.4. Auswertung der Daten

Die in jeder Gelfraktion gemessene Radioaktivität ergab auf der anodischen Seite (Fr. 1 - 13) für den Ansatz 1 einen Peak A_1, auf der kathodischen Seite (Fr. 14-26) den Peak B_1. Dasselbe ergibt sich auch für den Ansatz 2, nämlich einen anodischen Peak A_2 und einen kathodischen Peak B_2.
Die Differenz $\Delta = A_1 - A_2$ ist die supprimierbare Bindung, die als spezifische Bindung des radioaktiven Liganden im heißen Ansatz gilt (Moeller 1982).

Korrigiert wurde diese supprimierbare Bindung mit dem Quotienten des anodischen Peaks nach der Formel von Oettling (in Vorbereitung):

$$\Delta \text{corr} = A_1 - (A_2 \cdot \frac{B_1}{B_2})$$

Hieraus berechnete man dann den freien Rezeptor:

$$\Delta \text{corr} \times 8{,}4536 \times 10^{-18} = \text{mol/50 µl}$$

Hierbei gilt:

Δ corr $\hat{=}$ Konzentration der Rezeptorbindungsstellen angegeben in cpm/50 µl Inkubat

mol/50 µl $\hat{=}$ Konzentration der Rezeptorbindungsstellen in mol/50 µl Inkubat

Bestimmung des Steroidkomplexes:

Die beiden oben genannten Ansätze werden ebenso 24 h lang inkubiert. Das anschließende Verfahren gleicht dem der 1 h - Inkubation.

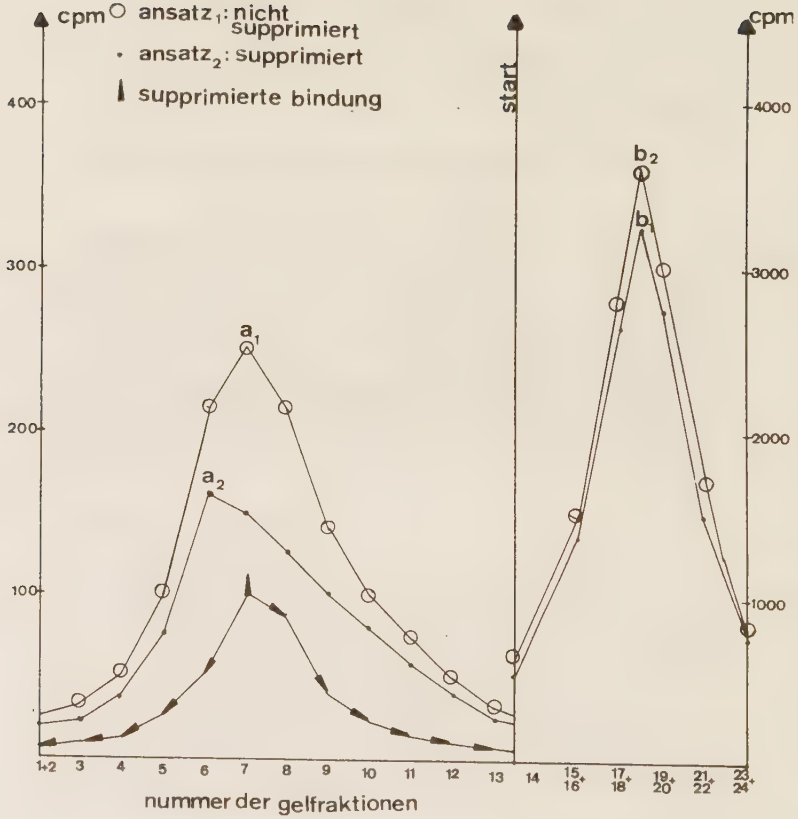

Abb.1: Fraktionierung der Agargelplatten nach der Elektrophorese

3. ERGEBNISSE

3.1. Primäre Daten

Erläuterungen zu den folgenden Tabellen

A) Kennzeichnung der Versuchsreihen
Insgesamt wurden 6 Versuchsgruppen pro Altersstufe benötigt. Die Versuche wurden mit 4 verschiedenen Altersstufen durchgeführt.
(3.1.1. - 3.1.24)

B) Anzahl der Tiere pro Teilversuche

C) Alter der Tiere in Tagen:
Für die Versuche wurden Tiere in den Altersstufen 25 d, 30 d, 35 d und 40 d benötigt.
Die Tiere wurden von einer Zuchtanstalt bezogen, deshalb kann es möglich sein, daß das angegebene Alter vom wahren Alter abweicht.

D) Prostatagesamtgewicht in mg pro Teilversuch

E) Prostatagewicht in mg pro Tier

F) Cytosol - Menge in µl
- Gesamtvolumen in µl pro Teilversuch

G) Cytosol - Menge in µl
- Volumen pro Tier in µl

H) µg Protein pro 50 µl Inkubat

J) DNA-Konzentration pro Homogenat (µg/ml)

K) DNA-Menge pro Tier in µg

L) Freier Rezeptor (fR) in (fmol) pro 50 µl Inkubat
- Wert nach 1 h - Inkubation

M) Rezeptor-Steroidkomplex in (fmol) pro 50 µl Inkubat
- Wert nach 24 h - Inkubation

Tabellen

A	3.1.1.	3.1.2.	3.1.3.	3.1.4.	3.1.5.	3.1.6.
B	18	18	18	18	18	18
C	30	30	30	30	30	30
D	340	355	380	345	400	370
E	18,88	19,72	23,75	19,16	22,22	20,55
F	1700	1775	1900	1725	2000	1850
G	94,44	98,61	118,75	95,83	111,11	102,78
H	150,0	137,5	192,5	155,0	150,0	137,5
J	1290	1170	1305	765	1470	1635
K	71,66	65,0	72,5	42,0	81,66	90,83
L	2,25	4,25	1,66	0,524	1,606	2,113
M	2,95	4,95	1,78	-	3,407	4,541

A	3.1.7.	3.1.8.	3.1.9.	3.1.10.	3.1.11.	3.1.12.
B	16	16	16	16	16	16
C	35	35	35	35	35	35
D	617	634	540	415	455	430
E	38,56	39,62	36	25,94	28,44	26,87
F	3085	3170	2700	2075	2270	2150
G	192,81	198,13	180,0	129,69	141,88	134,38
H	-	232,5	172,5	225,0	240,0	240,0
J	1740	2025	1515	1425	1357,5	1252,5
K	108,75	126,56	94,7	89,06	84,84	78,28
L	-	3,13	0,57	0,769	-	0.059
M	3,389	3,65	1,41	0,608	0,219	0,093

A	3.1.13.	3.1.14.	3.1.15.	3.1.16.	3.1.17.	3.1.18.
B	12	12	12	12	12	12
C	40	40	40	40	40	40
D	470	505	600	385	430	390
E	39,16	42,10	50,0	32,08	35,83	32,5
F	2350	2525	3000	1925	2150	1950
G	195,83	210,42	250,0	160,42	179,16	162,5
H	260,0	245,0	260,0	150,0	175,0	150,0
J	1680	1440	1470	1177,5	1275	1087,5
K	140,0	120,0	122,5	98,12	106,25	90,62
L	2,113	3,89	0,085	1,023	-	0,042
M	2,662	3,97	0,47	2,384	2,249	2,925

A	3.1.19.	3.1.20.	3.1.21.	3.1.22.	3.1.23.	3.1.24.
B	10	10	10	10	10	10
C	45	45	45	45	45	45
D	518	442	570	505	535	395
E	51,8	44,2	57,0	50,5	53,5	39,5
F	2590	2210	2850	2525	2675	1975
G	259	221,0	285,0	257,5	267,5	197,5
H	262,5	255	260,0	140,0	175,0	170,0
J	1462,5	1290	1095	1380	1635	1470
K	146,25	129,0	109,5	138,0	163,5	147,0
L	1,454	2,59	1,71	-	0,0592	0,014
M	2,40	2,42	0,72	0,574	-	0,363

3.2. Abgeleitete Ergebnisse

(Die folgenden abgeleiteten Ergebnisse wurden aus den Primärdaten rechnerisch ermittelt)

3.2.1. Bestimmung der Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata in (fmol/mg)

(Mittelwert der Prostaten aller Tiere eines Teilversuches)

Gleichung: $\frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{mg Prostata}} = \text{mol/mg}$

Es gilt: $\frac{\text{mg Prostata}}{\text{ml Cytosol}} = \text{g/l Prostata}$

$$\frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{l Cytosol}} : \frac{\text{g Prostata}}{\text{l Cytosol}} = \frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{g Prostata}}$$

Versuchsnr.	Werte	Versuchsnr.	Werte
3. 1. 1	0,8	3.1.13	0,75
3.1.2	1,51	3.1.14	1,39
3.1.3	0,59	3.1.15	0,03
3.1.4	0,18	3.1.16	0,36
3.1.5	0,57	3.1.17	-
3.1.6	0,75	3.1.18	0,015
3.1.7	-	3.1.19	0,5
3.1.8	1,11	3.1.20	0,92
3.1.9	0,20	3.1.21	0,61
3.1.10	0,30	3.1.22	-
3.1.11	-	3.1.23	0,021
3.1.12	0,15	3.1.24	0,15

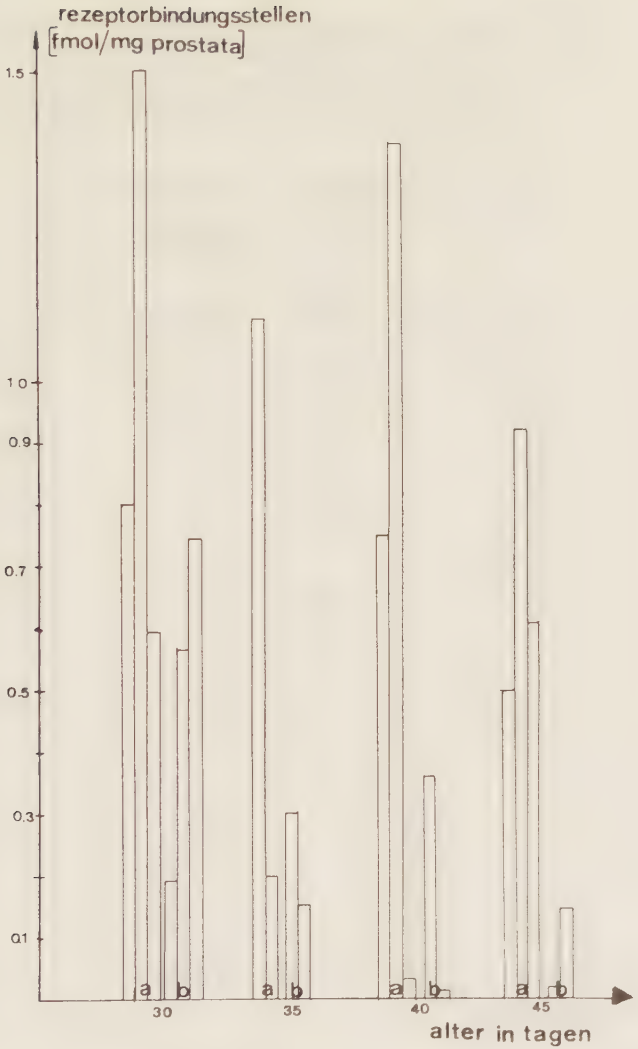

Abb. 3.2.1.: Konzentration der Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata in fmol/mg in Abhängigkeit vom Alter der Tiere in Tagen (Mittelwert der Prostaten aller Tiere eines Teilversuches; Zahl der Tiere s. 3.1. unter B)
a = unbehandelte Gruppen
b = mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

3.2.2. Bestimmung der Rezeptorbindungsstellen pro Prostata

in (fmol/Prostata in mg)

(Prostata, d.h. Mittelwert der Einzeltierprostata eines Tierversuchs)

Es gilt: $\frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{mg Prostata}}$ x Einzelprostata in mg = $\frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{Einzelprostata}}$

Versuchsnr.	Werte	Versuchsnr.	Werte
3.1.1.	15,10	3.1.13.	29,37
3.1.2.	29,78	3.1.14.	58,52
3.1.3.	14,01	3.1.15.	1,50
3.1.4.	3,45	3.1.16.	11,55
3.1.5.	12,67	3.1.17.	-
3.1.6.	15,41	3.1.18.	0,49
3.1.7.	-	3.1.19.	25,90
3.1.8.	43,98	3.1.20.	40,66
3.1.9.	7,20	3.1.21.	34,77
3.1.10.	7,77	3.1.22.	-
3.1.11.	-	3.1.23.	1,12
3.1.12.	0,40	3.1.24.	5,90

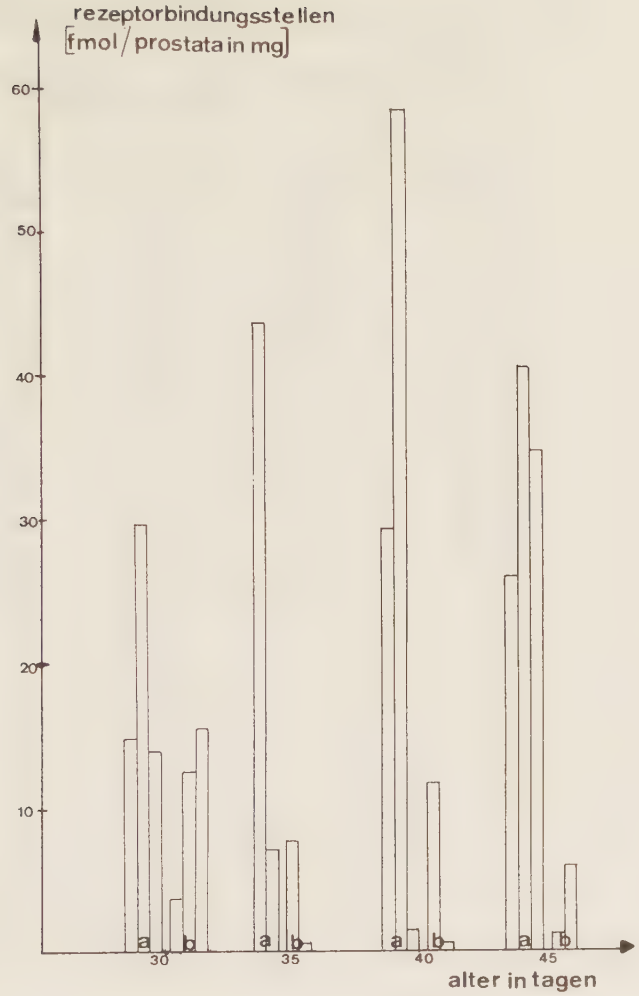

Abb. 3.2.2.: Konzentration der Rezeptorbindungsstellen pro Prostata in fmol/mg in Abhängigkeit vom Alter der Tiere in Tagen (Mittelwert der Prostata eines Tieres von einem Teilversuch; Zahl der Tiere s. 3.1. unter B)

a = unbehandelte Gruppen

b = mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

3.2.3. Bestimmung der Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA

in (fmol/mg)

Es gilt: $\frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{1 Cytosol}} : \frac{\text{mg DNA}}{\text{1 Cytosol}} = \frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{mg DNA}}$

Versuchsnr.	Werte	Versuchsnr.	Werte
3.1. 1.	210,00	3.1.13.	211,00
3.1. 2.	457,00	3.1.14.	485,00
3.1. 3.	170,43	3.1.15.	12,24
3.1. 4.	85,00	3.1.16.	119,00
3.1. 5.	150,00	3.1.17.	-
3.1. 6.	170,00	3.1.18.	5,40
3.1. 7.	-	3.1.19.	186,00
3.1. 8.	346,00	3.1.20.	317,00
3.1. 9.	71,79	3.1.21.	318,95
3.1.10.	79,00	3.1.22.	-
3.1.11.	-	3.1.23.	6,89
3.1.12.	52,00	3.1.24.	41,00

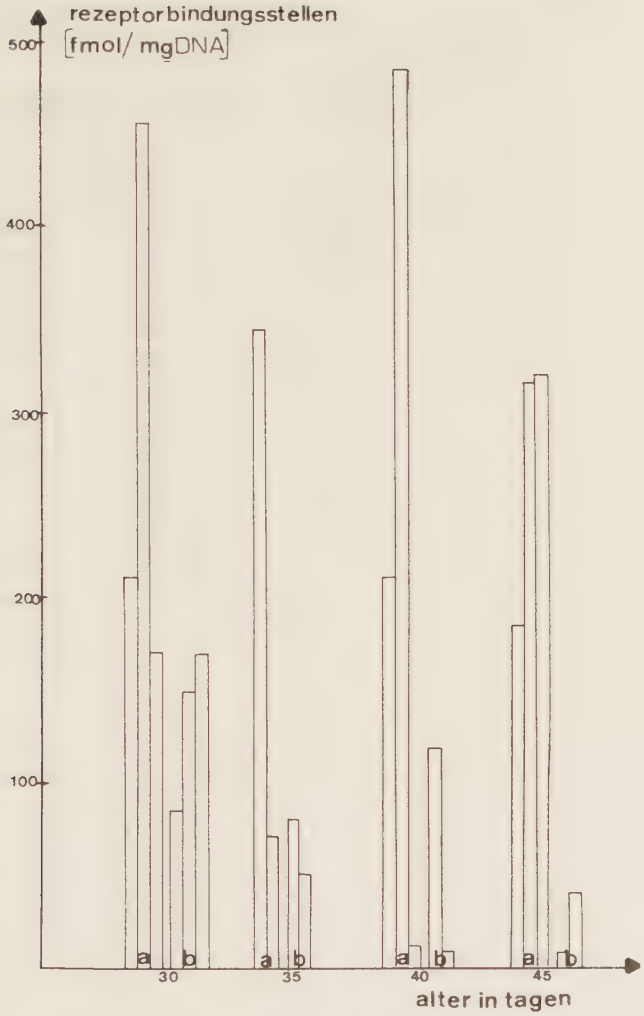

Abb. 3.2.3.: Konzentration der Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA in fmol/mg in Abhängigkeit vom Alter der Tiere in Tagen.
a = unbehandelte Gruppen
b = mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

3.2.4. Bestimmung der Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein

in (fmol/mg)

Es gilt: $\frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{l Cytosol}} : \frac{\text{g Protein}}{\text{l Cytosol}} = \frac{\text{mol Rezeptor}}{\text{g Protein}}$

Versuchsnr.	Werte	Versuchsnr.	Werte
3.1. 1.	53,00	3.1.13.	30,00
3.1. 2.	109,75	3.1.14.	56,45
3.1. 3.	30,55	3.1.15.	1,15
3.1. 4.	12,00	3.1.16.	24,00
3.1. 5.	38,00	3.1.17.	-
3.1. 6.	54,00	3.1.18.	1,00
3.1. 7.	-	3.1.19.	19,80
3.1. 8.	47,74	3.1.20.	36,00
3.1. 9.	9,93	3.1.21.	23,31
3.1.10.	12,00	3.1.22.	-
3.1.11.	-	3.1.23.	6,80
3.1.12.	6,20	3.1.24.	8,00

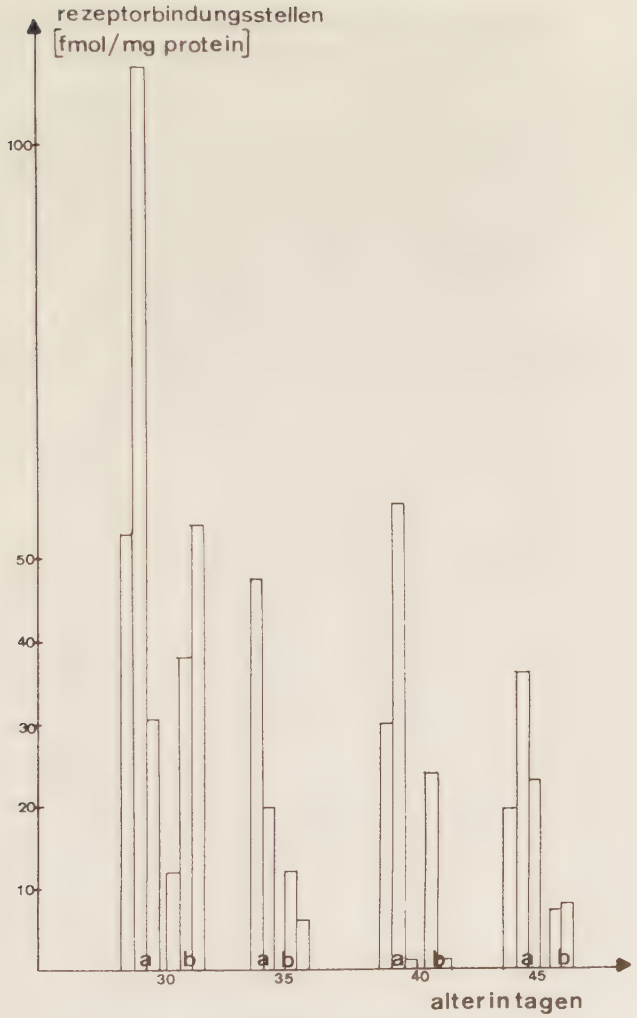

Abb. 3.2.4.: Konzentration der Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein in fmol/mg in Abhängigkeit vom Alter der Tiere in Tagen.
a = unbehandelte Gruppen
b = mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

Bei diesen Versuchsreihen dienten pro Altersgruppe 3 Kontrollgruppen und 3 mit Androcur behandelte Gruppen als Vergleichspunkte.
Diese Kontrollgruppen und Androcur-Gruppen wurden untereinander und miteinander verglichen. Genauso verglich man die CA- mit den Kontrollgruppen der entsprechenden Altersklassen miteinander.
Die Abbildung 3.2.1./2./3./4. zeigen die Rezeptorbindungsstellen in fmol aller Gruppen einzeln.
Die mit a bezeichneten Abbildungen stellen die Mittelwerte $\pm$ S der 3 Kontrollgruppen und 3 CA-Gruppen in fmol pro Altersklasse dar.

3.2.5. Mittelwert und Standardabweichungen /2p-Werte

Ermittelt wurden die Werte mit den zweiseitigen "Student t-Test", so daß 2p p entspricht. Jeder Mittelwert wurde jeweils aus drei Gruppen ermittelt.
Hier wurden die Kontrollgruppen miteinander und die behandelten Gruppen untereinander verglichen.
($\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung;
2p gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die 0-Hypothese abgelehnt werden kann).

3.2.1. a Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata

1. Kontrollgruppen

Gruppen	$\bar{x}$	s	2p
30d	0,967	0,482	
gegen 35d	0,655	0,644	0,60
" 40d	0,723	0,680	0,70
" 45d	0,677	0,218	0,40
35d	0,655	0,644	
gegen 40d	0,723	0,681	0,95
" 45d	0,678	0,218	0,975
40d	0,723	0,618	
gegen 45d	0,677	0,218	0,95

2. mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

30d	0,500	0,292	
gegen 35d	0,255	0,106	0,40
" 40d	0,188	0,244	0,40
" 45d	0,086	0,091	0,20
35d	0,255	0,106	
gegen 40d	0,188	0,244	0,90
" 45d	0,086	0,091	0,30
40d	0,188	0,244	
gegen 45d	0,086	0,091	0,70

3.2.2. a Rezeptorbindungsstellen pro Einzelprostata

1. Kontrollgruppen

Gruppen		$\bar{x}$	s	2p
	30d	19,630	8,807	
gegen	35d	25,590	26,008	0,80
"	40d	29,797	28,513	0,60
"	45d	33,777	7,430	0,20
	35d	25,590	26,008	
gegen	40d	29,797	28,513	0,90
"	45d	33,777	7,430	0,70
	40d	29,797	28,513	
gegen	45d	33,777	7,430	0,90

2. mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

	30d	10,510	6,266	
gegen	35d	4,085	5,212	0,40
"	40d	6,020	7,821	0,60
"	45d	3,510	3,380	0,30
	35d	4,085	5,212	
gegen	40d	6,020	7,821	0,80
"	45d	3,510	3,380	0,95
	40d	6,020	7,821	
gegen	45d	3,510	3,380	0,80

3.2.3. a Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA

1. Kontrollgruppen

Gruppen		$\bar{x}$	s	2p
	30d	279,143	155,294	
gegen	35d	208,895	193,896	0,70
"	40d	236,080	273,376	0,90
"	45d	273,983	76,202	0,975
	35d	208,895	193,896	
"	40d	236,080	237,376	0,95
"	45d	237,983	76,202	0,70
	40d	236,080	237,376	
gegen	45d	273,983	76,202	0,90

2. mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

	30d	135,00	44,441	
gegen	35d	65,500	19,092	0,20
"	40d	66,200	80,327	0,30
"	45d	23,945	24,120	0,10
	35d	65,500	19,092	
gegen	40d	62,200	80,327	0,975
"	45d	23,945	24,120	0,20
	40d	62,200	19,092	
gegen	45d	23,945	24,120	0,60

3.2.4. a Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein

1. Kontrollgruppen

Gruppen		$\bar{x}$	s	2p
	30d	64,433	40,819	
gegen	35d	28,835	26,736	0,40
"	40d	29,200	27,659	0,30
"	45d	26,370	8,523	0,30
	35d	28,835	26,736	
gegen	40d	29,200	27,659	0,99
"	45d	26,370	8,523	0,90
	40d	29,200	27,659	
gegen	45d	26,370	8,523	0,90

2. mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

	30d	34,667	21,198	
gegen	35d	9,100	4,101	0,30
"	40d	12,500	16,264	0,40
"	45d	7,400	0,849	0,20
	35d	9,100	4,101	
gegen	40d	12,500	16,264	0,90
"	45d	7,400	0,849	0,70
	40d	12,500	16,264	
gegen	45d	7,400	0,849	0,80

Hier wurden Kontrollgruppen mit den behandelten Gruppen entsprechender Altersklassen verglichen. (pk = Kontrollgruppen; p = behandelte Gruppen)

3.2.1. a Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata.

Gruppen	$\bar{x}$	s	2p
pk (30d) gegen	0,967	0,482	0,30
p (30d)	0,500	0,291	
pk (35d) gegen	0,655	0,644	0,50
p (35d)	0,225	0,106	
pk (40d) gegen	0,723	0,680	0,40
p (40d)	0,188	0,244	
pk (45d) gegen	0,677	0,218	0,05
p (45d)	0,086	0,091	

3.2.2. a Rezeptorbindungsstellen pro Einzelprostata

pk (30d) gegen	19,630	8,808	0,30
p (30d)	10,510	6,266	
pk (35d) gegen	25,590	26,008	0,40
p (35d)	4,085	5,212	
pk (40d) gegen	29,797	28,513	0,40
pk (40d)	6,020	7,821	
pk (45d) gegen	33,777	7,430	0,02
pk (45d)	3,510	3,380	

3.2.3. a Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA

Gruppen	$\bar{x}$	s	2p
pk (30d) gegen	279,143	155,294	0,20
p (30d)	135,000	44,441	
pk (35d) gegen	208,895	193,896	0,40
p (35d)	65,500	19,092	
pk (40d) gegen	236,080	237,376	0,50
p (40d)	62,200	80,327	
pk (45d) gegen	273,983	76,202	0,025
p (45d)	23,945	24,119	

3.2.4. a Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein

pk (30d) gegen	64,433	40,819	0,40
p (30d)	34,667	21,819	
pk (35d) gegen	28,835	26,736	0,50
p (35d)	9,100	4,101	
pk (40d) gegen	29,200	27,659	0,600
p (40d)	12,500	16,264	0,10
pk (45d) gegen	26,370	8,523	0,10
p (45d)	7,400	0,846	

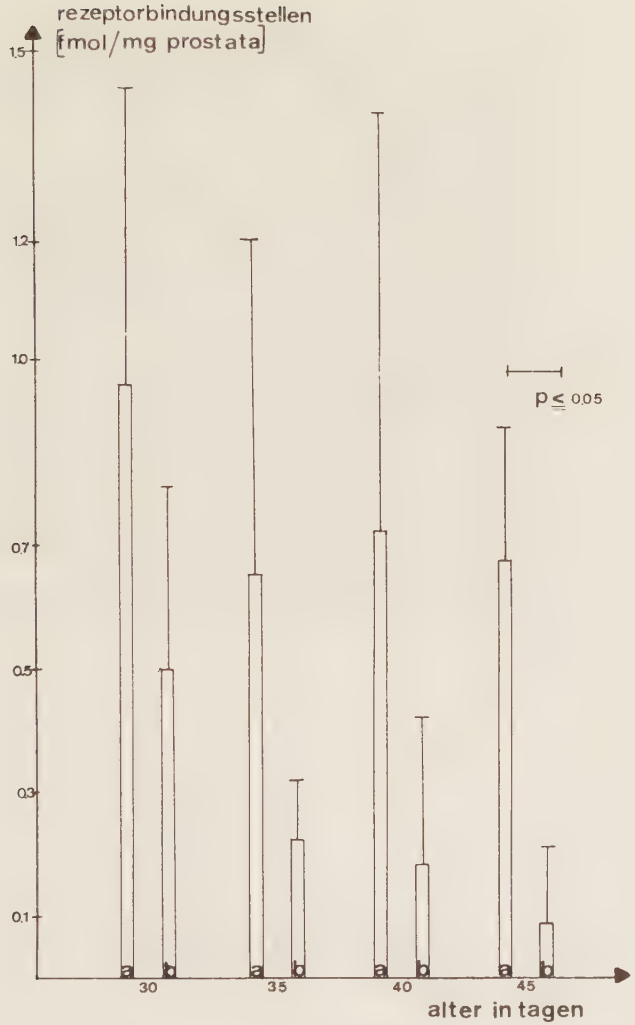

Abb. 3.2.1. a.: Mittelwert und Standardabweichung der Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostata in fmol/mg in Abhängigkeit vom Alter der Tiere in Tagen (Mittelwert der Prostaten aller Tiere einer Altersstufe; Zahl der Tiere s. 3.1. unter B)
a = unbehandelte Gruppen
b = mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

Zu Abb. 3.2.1. a

Es zeigt sich deutlich, daß die Rezeptorbindungsstellen pro mg Prostate der CA-Gruppen gegenüber den Kontrollgruppen abnehmen.
Bei den 30 d CA-Gruppen verringern sich die Bindungsstellen gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen um 50 %, bei den 35 d CA-Gruppen um 65 % und bei den 40 d CA-Gruppen um 53 %. Eine signifikante Verminderung läßt sich nur bei den 45 d.- CA-Gruppen feststellen. Diese liegt auf dem Niveau $p \cong 0{,}05$.
Beim Vergleich der Kontrollgruppen untereinander ergibt sich eine Abnahme von den 30 d zu den 35 d-Gruppen um 31 %, die 40 d und 45 d-Gruppen bleiben beinahe auf demselben Niveau wie die 35 d -Gruppen.
Die mit CA- behandelten Gruppen zeigen vom 30. Tag an einen deutlichen Abfall der Bindungsstellen, wobei sie am 45. Tag den tiefsten Wert erreichen.
Signifikante Unterschiede ergeben sich demnach keine.

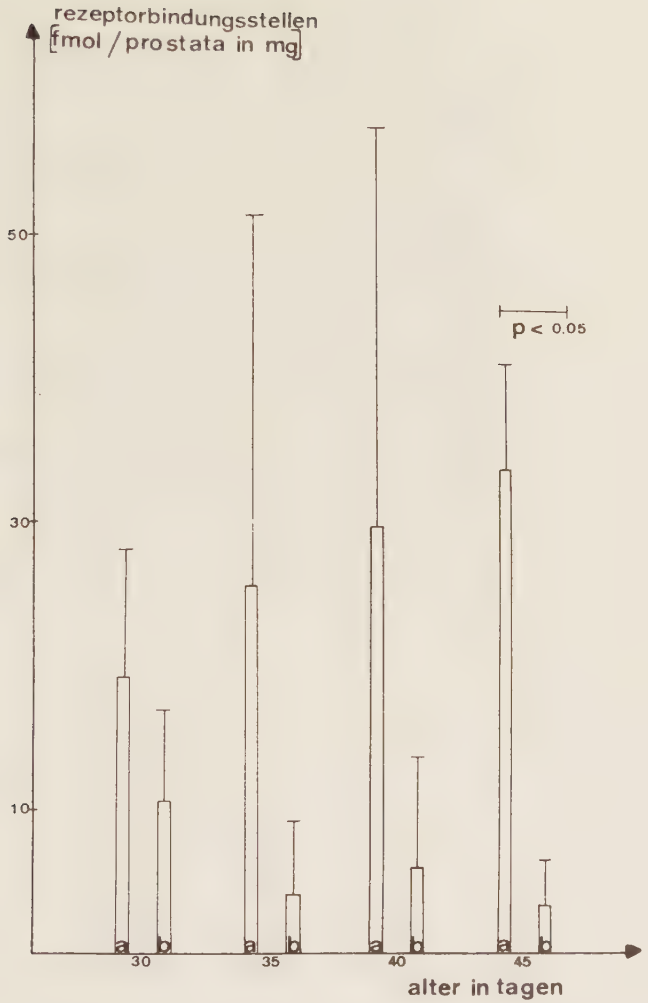

Abb. 3.2.2. a.: Mittelwert und Standardabweichung der Rezeptorbindungsstellen pro Prostata in fmol/mg in Abhängigkeit vom Alter der Tiere in Tagen (Mittelwert der Prostata eines Tieres von einer Altersstufe; Zahl der Tiere s. 3.1. unter B).

a = unbehandelte Gruppen

b = mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

Zu Abb. 3.2.2. a

Auch hier zeigt sich wie in Abb. 3.2.1. a, daß die CA-Gruppen gegenüber den Kontrollgruppen deutlich an Bindungsstellen verlieren.
Bei den 35 d, 40 d und 45 d CA-Gruppen fallen die Werte z. Teil um mehr als 80 % gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen ab.
Eine signifikante Verminderung ergibt sich bei den 45 d CA-Gruppen, sie liegt auf dem Niveau $p \leq 0{,}02$.
Die Werte der Kontrollgruppen steigen von den 30 d Tieren bis zu den 45 d Tieren leicht an.
Beim Vergleich der CA-Altersgruppen ergibt sich eine Abnahme der Werte vom 35. Tag an.
Den niedrigsten Wert zeigen die 45 d CA-Gruppen, signifikante Unterschiede treten keine auf.

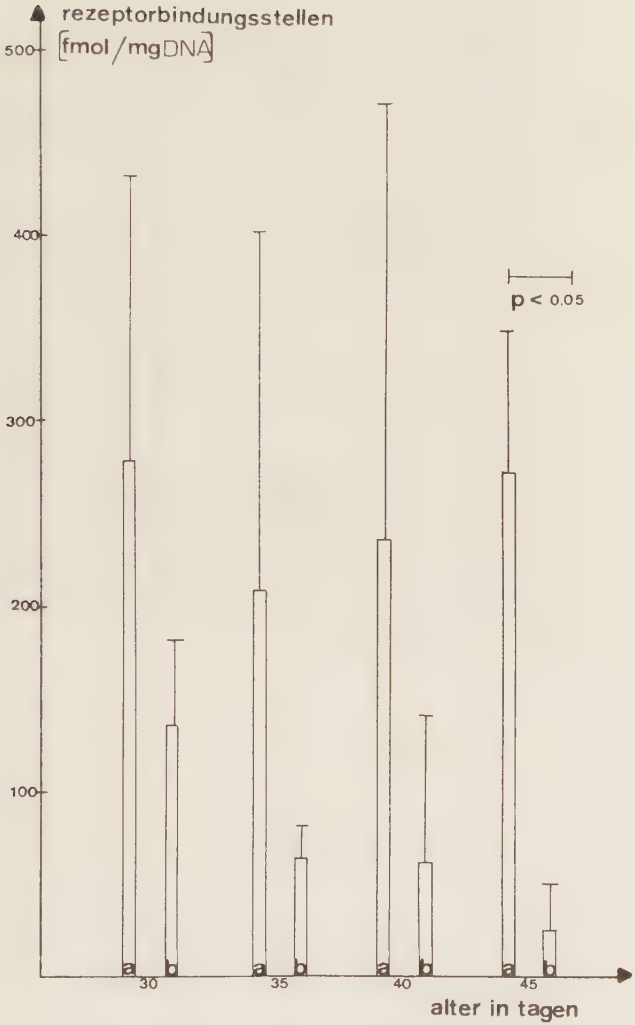

Abb. 3.2.3. a.: Mittelwert und Standardabweichung der Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA in fmol/mg in Abhängigkeit vom Alter der Tiere in Tagen.
a = unbehandelte Gruppen
b = mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

Zu Abb. 3.2.3. a

Die Rezeptorbindungsstellen zeigen bei den 30 d Kontrollgruppen den höchsten Wert, fallen bei den 35 d - Tieren wieder ab, um bei den 40 d und 45 d-Tieren wieder leicht anzusteigen.
Bei den CA-Gruppen weisen ebenfalls die 30 d-Gruppen den höchsten Wert auf, 35 d und 40 d-Gruppen erreichen noch etwa 50 % des Wertes der 30 d-Tiere. Die 45 d-Tiere ergeben den tiefsten Wert an Rezeptorbindungsstellen pro mg DNA.
Vergleicht man die Kontrollgruppen mit den CA-Gruppen, so ergibt sich eine starke Abnahme der Bindungsstellen bei den CA-Tieren.
Bei den 30 d -CA-Gruppen zeigt sich eine Abnahme um 51 %, bei den 35 d -CA-Gruppen um 62 % und bei den 40 d -CA-Gruppen um 74 % gegenüber den Kontrollgruppen.
Eine signifikante Verminderung der Bindungsstellen ergibt sich nur bei den 45 d -CA-Gruppen, sie liegt auf dem Niveau $p \hat{=} 0{,}025$.

Abb. 3.2.4. a.: Mittelwert und Standardabweichung der Rezeptorbindungsstellen pro mg Protein in fmol/mg in Abhängigkeit vom Alter der Tiere in Tagen.
a = unbehandelte Gruppen
b = mit Cyproteronacetat behandelte Gruppen

Zu Abb. 3.2.4. a

Die 30 d - Kontrolltiere weisen den höchsten Wert an Bindungsstellen auf, die 35 d - Gruppen fallen um ca. 60 % des 30 d - Wertes ab. Auf diesem Wert verbleiben auch die beiden restlichen Kontrollgruppen.
Die CA-Gruppen fallen gegen die Kontrollgruppen wieder stark ab, wobei die 30 d - Gruppen den höchsten Wert ergeben; die 35 d - Gruppen fallen um 67 %, die 40 d - Gruppen um 57 % des Wertes der Kontrollgruppe ab.
Die 45 d CA-Gruppen weisen den niedrigsten Wert mit 7,4 fmol/mg Protein auf.
Signifikante Werte lassen sich überhaupt keine feststellen.

In allen Abbildungen haben sich große Standardabweichungen ergeben und zwar in allen Altersgruppen. Signifikante Unterschiede zeigten sich nur beim Vergleich der 45 d Kontrollgruppen mit den 45 d CA-Gruppen.

4. DISKUSSION

4.1. Quantitative Bestimmung des Androgenrezeptors

Die Bestimmungsmethode des Androgenrezeptors liegt in 2 wichtigen Schritten, nämlich der Markierung und der Separierung.

Die Markierung erfolgte mit radioaktivem Hormon. Die Separierung wurde mit der Agarelektrophorese durchgeführt.

4.1.1. Markierung mit ^{3}H-DHT in vitro

Man verwendete den natürlichen Liganden ^{3}H-DHT trotz seiner beiden Nachteile bei der Inkubation:
er wird einmal nicht nur von Androgenrezeptoren, sondern auch von SHBG mit mehr Affinität gebunden. Zum zweiten kann ^{3}H-DHT während der Inkubation zu 5α-Androstandiolen hydriert werden, das vom Rezeptor nicht gebunden wird. Um die Hydrierung von ^{3}H-DHT zu 5α-Androstandiolen zu vermeiden, gab man zum DST-Puffer NAD-ase (Moeller et. al. 1982, Moeller 1982) dazu.
Die störende Bindung an SHBG kann durch die Separierung mit der Agarelektrophorese (Wagner, 1972) eliminiert werden (Moeller, 1982).

4.1.2. Inkubationszeit und -temperatur

Im Cytosol mißt man einen Anteil schnell und einen Anteil langsam markierbaren Rezeptors (Snochowski u.a.1977, Menon u.a. 1978).
In der ersten Inkubationsstunde werden max. 60% und erst nach ca. 20 Std. 100 % des meßbaren Rezeptors markiert.

Aufgrund dieser Ergebnisse inkubierte man das Cytosol 1 h und 24 h lang zur Bestimmung des schnell und langsam markierbaren Rezeptors.
Inkubiert wurde grundsätzlich bei 0 - 4° C, um Rezeptorverluste zu vermeiden (Moeller, 1982).

4.1.3. Trennung mittels Agarelektrophorese

Die Elektrophorese wurde von Wagner (1972) eingeführt. Er gebrauchte sie zur Charakterisierung von steroidgebundenem Protein im Serum und Steroidrezeptoren. Die zu untersuchende Probe trägt man in der Mitte des elektrischen Feldes auf; daraufhin wandern die an saure cytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren gebundenen Liganden in Richtung der Anode, während die ungeladenen und ungebundenen Liganden durch einen endosmotischen Pufferstrom in Richtung Kathode gespült werden. Der kathodische Peak enthält auch noch den größten Anteil der unspezifisch gebundenen Liganden. SHBG - gebundene Liganden finden sich in einem hiervon deutlich getrennten kathodischen Peak nahe dem Startloch. Die Methode eignet sich gut für die Trennung cytoplasmatischer und nukleärer Rezeptoren von SHBG, ungebundenen Liganden und einem Teil der unspezifisch gebundenen Liganden.
Die Bindung an SHBG ist jedoch nicht von Bedeutung in diesen Versuchen, da die Ratte kein SHBG besitzt.

4.1.4. Supprimierung der spezifischen Bindung

Diese Methode nutzt die Tatsache, daß die Konzentration an Rezeptorbindungsstellen klein ist ("low capacity") gegen die der unspezifischen Bindungsstellen ("high capacity"). Parallel zum "heißen" Ansatz wird ein "supprimierter" Ansatz gemacht.
Dieser "supprimierte" Ansatz enthält den markierenden radioaktiven Liganden ^{3}H-DHT und noch unmarkiertes R 1881 in 100-fachem Überschuß.
Damit wird die Bindung des radioaktiven Liganden an den Rezeptor im "supprimierten" Ansatz auf 1 % im Vergleich zum "heißen" Ansatz herunterverdünnt. Die Differenz, die "supprimierbare" Bindung, wird als die spezifische Bindung des radioaktiven Liganden im "heißen" Ansatz angesehen (Moeller, 1982).

Man verwendete R 1881 als supprimierenden Liganden, obwohl man mit ^{3}H-DHT markierte, da die Metabolisierung von ^{3}H-DHT zu ^{3}H-Androstandiolen auch durch Zusatz von NAD-ase nicht vollständig gehemmt werden kann. Man muß damit rechnen, daß auch im "heißen" Ansatz stets ca. 20 % ^{3}H-DHT metabolisiert werden.
Würde man unmarkiertes DHT in 100fachem Überschuß dazugeben, so würde es die Metabolisierung von ^{3}H-DHT im "supprimierten" Ansatz hemmen und damit stünde im "supprimierten"Ansatz mehr ^{3}H-DHT zur unspezifischen Bindung zur Verfügung als im "heißen" Ansatz.
Dies würde dazu führen, daß die "supprimierbare" Bindung $\Delta = A_1 - A_2$ zu niedrige, sogar negative Werte annehmen würde.
Dieser Fehler ist ausschaltbar, wenn man mit R 1881 supprimiert, das die Konversion von ^{3}H-DHT unbeeinflußt läßt.
Um die gesamte Bestimmung noch zu verbessern, wird die "supprimierbare" Bindung nach der Formel von Oettling (Dissertation in Vorbereitung) korrigiert:

$$\Delta corr = A_1 - A_2 \left(\frac{B_1}{B_2}\right) \qquad (2.6.4)$$

Diese Formel dient vorwiegend dazu, einen systematischen Fehler auszuschalten:
im "supprimierten" Ansatz liegt mehr heißes Hormon zur unspezifischen Bindung vor als im "heißen" Ansatz.
Dieser Fehler läßt sich mit der Oettling'schen Formel korrigieren, nebenbei lassen sich damit noch Pipettierfehler bis zu etwa 10 % herausrechnen.

4.1.5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der modifizierten Methode von Schaffner und Weissman durchgeführt und nicht nach der herkömmlichen von Lowry.
Bei der herkömmlichen Methode wird die Bestimmung durch große Mengen von SH - Gruppen gestört, während Amidoschwarz dadurch nicht gestört wird.

Die Eichkurve der Proteinbestimmung war zwischen 0 und 30 µg linear:
Die Extinktionen der eigentlichen Proteinbestimmung lagen zwischen 0,500 (≙ 14 µg Protein) und 0,780 (≙ 26,25 µg Protein). Die gemessenen Proteinwerte lagen somit im linearen Bereich der Eichkurve.
Die Nachweisgrenze kann als genügend angesehen werden.

4.1.6. DNA-Bestimmung

Es wurde die Methode von Burton angewendet. Die DNA-Bestimmung liegt darin, daß als Standardsubstanz DNA verwendet wird, wobei von uns anstelle von DNA Desoxyribose verwendet wurde.
Die Standardkurve war im Bereich von 0 bis 15 µg/ml linear.
Die Extinktionswerte der eigentlichen DNA-Bestimmung lagen zwischen 0,275 (≙ 5,1µgdR/ml) und 0,690 (≙ 9,75 µg dR/ml).
Die Nachweisgrenze kann somit als genügend angesehen werden.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Rezeptorbindungsstellen der Kontrolltiere

Die Rezeptorbindungsstellen der unbehandelten Tiere zeigen in den 4 Graphiken (siehe Tabellen 3.2.1, 2., 3. und 4.) den höchsten Wert am 30. Tag, den niedrigsten Wert am 45. Tag.
Diese Ergebnisse weichen von den erzielten Werten von Moeller et. al. (1981) ab:
Sie machten Versuche mit 20 - 70 d alten Tieren, dabei fanden sie am 35. Tag ein Maximum, am 30. Tag und am 45. Tag jeweils ein Minimum.

Diese Abweichungen von den Landerschen Werten (Lander in Vorbereitung; Moeller (1982)) läßt sich mit dem Alter der Tiere erklären, das um einige Tage differieren kann, da die Tiere von einer Tierzucht (Ivanovas, Kisslegg) stammten.
Andererseits könnten diese Ergebnisse auch von jahreszeitlichen Hormonschwankungen abhängen.
Lander nahm seine Versuche im Winter vor, ich dagegen in den Monaten Juli, August, September und Oktober.
Diese Vermutung ließ sich bislang noch nicht prüfen, zumal unsere Tiere bei künstlichem Licht gehalten wurden und somit nicht mit Sonnenlicht in Berührung kamen.
Man diskutiert jedoch, daß die Ratte eine Art "innere Uhr" für die Jahreszeiten besitzt, welcher Art diese "Uhr" sein soll, ist jedoch noch unbekannt.
(Hughes et. al. (1976)).

Am 30. Tag liegt bei den Ratten eine Phase des schnellen Prostatawachstums vor, bei der sich die Rezeptorkonzentration verkleinert (Moeller, 1982). Das hierbei erzielte Maximum meiner Ergebnisse läßt sich nicht in Einklang bringen mit den Ergebnissen von Moeller (1982).

Es wird allgemein angenommen, daß die Konzentration des Androgenrezeptors durch die Konzentration zirkulierender Hormone reguliert wird.
Dies bedeutet, daß die Androgenrezeptor-Konzentration vom Hypothalamisch-Hypophysären System gesteuert wird (Zsfass. bei Moeller (1982).

Gupta et. al. (1974) fanden jedoch bei intakten männlichen Ratten im Serum, daß am 26. Tag das Testosteron steigt und etwas später auch das DHT.
Gleichzeitig steigt das LH an, erreicht sein Maximum am 30. Tag; FSH dagegen erst am 33. Tag.

Moeller et. al. (1981) fanden bei Versuchen mit Ratten zwischen 20 - 56 d Tagen heraus, daß T, DHT, LH und FSH nicht mit der Androgenrezeptor-Konzentration korrelieren.
Diese Befunde machten deutlich, daß weitere Faktoren für die Regulierung der Rezeptorkonzentration verantwortlich sind.

Stützle (1983) fand bei der Bestimmung der Prolactin-Konzentration im Plasma männl. Ratten (15d - 90d alt), daß am 28. Tag ein Minimum, am 37. Tag ein erstes Maximum und am 58. Tag ein zweites Maximum vorliegt.
Unabhängig zeigte sich bei Rezeptorkonzentrationuntersuchungen von Lander (1982), daß die Konzentration von Prolactin und Rezeptor im Serum parallel verlaufen.
Bei beiden ergab sich auch, daß T- und DHT-Konzentration zeitlich versetzt zur Rezeptor- und Prolactinkonzentration verläuft.
Worauf diese Parallelität zurückzuführen ist, ist noch unbekannt, genau wie die Rolle des Prolactins selbst. Es ist lediglich bekannt, daß Prolactin das Wachstum der Prostata und des Samenbläschens der männlichen unreifen Ratten steigert (Negro-Vilar et. al. (1973)).

Auf Grund der Ergebnisse von Lander (1982) und Stützle (1983) nahmen Moeller und Gupta (1983) Versuche mit Bromocryptin, einem prolactinsenkenden Mittel, vor und stellten fest, daß das Prostatagewicht u. die Androgenrezeptorkonzentration sanken.
Dieser Versuch brachte einen weiteren Hinweis, daß die Androgenrezeptor-Konzentration vor allem mit der Konzentration von Prolactin im Serum korreliert.
Dies könnte bedeuten, daß die Androgenrezeptor-Konzentration außer durch zirkulierende Hormone auch von Prolactin kontrolliert wird.

Diese Beziehung zwischen Prolactin und Androgenrezeptor-Konzentration könnte auch eine Ursache meines Peaks am 30. Tag darstellen. Dies läßt sich jedoch nicht belegen, da ich selbst keine Prolactinbestimmungen durchführte, und Lander und Stützle ihr Maximum am 37. Tag erzielten, das jedoch auf jahreszeitliche Hormonschwankungen zurückführbar sein könnte.
Am 45. Tag liegt bei meinen Werten auch ein Tiefpunkt vor, der jedoch nicht so stark zu meinen anderen Werten abfällt, wie es bei Lander der Fall ist.
Bei den Rezeptorbindungsstellen bezogen auf DNA steigt der 45d - Wert sogar wieder minimal an.
Bei den Bindungsstellen bezogen auf die Einzelprostata findet man, daß am 30. Tag ein Einbruch, dann eine leichte Steigerung der Werte vorliegt, um dann am 45. Tag den Gipfel zu erreichen. Die Ursache hierfür ist unbekannt.

In der Gesamtbetrachtung hat sich gezeigt, daß die Androgenrezeptor-Konzentration nicht nur von einem Faktor bestimmt wird, sondern von mehreren.
Diese Faktoren sind einerseits die zirkulierenden Hormone, die jedoch nicht parallel laufen mit der Androgenrezeptor-Konzentration.
Andererseits hat sich gezeigt, daß die Androgenrezeptor-Konzentration Parallelen zur Prolactinkonzentration im Serum aufweist (Lander in Vorbereitung u. Stützle (1983)).

4.2.2. Rezeptorbindungsstellen der behandelten Tiere

Alle 4 Tabellen zeigen bei den behandelten Tieren beinahe genau dasselbe Bild:
Am 30. Tag liegt ein Hochpunkt vor, dann erfolgt das Abfallen der Werte, um am 45. Tag den Tiefpunkt zu erreichen.
Vergleicht man die Kontrolltiere mit den behandelten Tieren, so zeigt sich, daß die Werte der behandelten Tiere

stark gegenüber denen der Kontrolltiere abfallen, aber sonst dieselben Maxima und Minima erreichen. Außer bei den Rezeptorbindungsstellen, bezogen auf die Einzelprostata, zeigen die CA-Werte der anderen Tabellen das Abbild von den Werten der Kontrolltiere. Bei den Rezeptorbindungsstellen, bezogen auf die Einzelprostata, ergibt sich bei den Kontrolltieren am 30. Tag ein Minimum und am 45. Tag ein Maximum, wogegen die CA-Tiere genau wie bei den anderen Tabellen am 30. Tag ein Maximum und am 45. Tag ein Minimum aufweisen.
Außerdem fiel auf, daß die Abnahme der Bindungsstellen von den Kontrolltieren zu den behandelten Tieren in den entsprechenden Altersklassen nicht gleichmäßig und kontinuierlich vor sich geht.
Beim Vergleich der Kontrolltiere mit den CA-Tieren zeigt sich, daß lediglich die 45d-Tiere signifikante Unterschiede aufweisen und da auch nur auf dem Niveau $p \leq 0{,}05$. In Prozent ausgedrückt ließ sich aber feststellen, daß unter der CA-Behandlung die Besetzung der Rezeptorbindungsstellen um durchschnittlich 31 % absinkt.

Nach Ergebnissen von Neumann und Steinbeck (1974) und von Yates and King (1980) wirkt CA als kompetitiver Hemmer um die Rezeptorbindungsstellen des DHT. CA wirkt aber auch nur in Anwesenheit von Testosteron (Yates and King (1980)).
Moeller und Goecke (1983) machten Versuche mit 63d alten, kastrierten Ratten, die sie 7d lang mit CA s.c. behandelten. Sie fanden dabei heraus, daß der cytoplasmatische Androgen-Rezeptor trotz Kastration erheblich stieg und der Komplex CA und Rezeptor nicht in den Kern wandern kann. Auf Grund dieser Ergebnisse nahm man an, daß CA die Synthese des Prostataandrogenrezeptors induziert, unabhängig von der Translokation des Rezeptors in den Kern.

Bei meinen Ergebnissen hat sich gezeigt, daß unter der CA-Behandlung ein deutlicher Rückgang an Androgenrezeptor-Bindungsstellen zu verzeichnen ist, d. h., daß dieser Rückgang eine direkte Wirkung des CA darstellen muß.
Allerdings liegen nun zwei konträre Ergebnisse über die Wirkung des CA vor.
Welcher Art der Wirkungsmechanismus des CA nun entspricht, muß noch geprüft werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In den ventralen Prostatalappen von 30 - 45 Tage alten Ratten wurden im Abstand von 5 Tagen die Konzentration des cytoplasmatischen Androgenrezeptors, der DNA und des löslichen Proteins im 100 000 g Überstand und das Prostatagewicht zu diesem Zeitpunkt gemessen. Die Ratten wurden vor den Versuchen stets 4 Tage lang mit Cyproteronacetat, einem Antiandrogen, s.c. behandelt. Die Dosis betrug 10 mg/kg Körpergewicht. Am 5. Tag wurden die Tiere dann durch Dekapitation getötet.

Zur quantitativen Bestimmung des Androgenrezeptors wurde dieser zuvor mit ^{3}H-DHT markiert.
Nach der Inkubation wurde mittels der Agarelektrophorese von Wagner (1972), modifiziert von Moeller et. al. (1980, 83), nicht spezifisch gebundenes ^{3}H-DHT abgetrennt. In Parallelansätzen supprimierte man die spezifische Bindung von ^{3}H-DHT an den Rezeptor mit R-1881. Die Konzentration der supprimierten Bindung ist die der Bindungsstellen.

Die Messungen ergaben sowohl bei den Kontrollgruppen als auch bei den behandelten Gruppen am 30. Tag ein Maximum und am 45. Tag ein Minimum:
(R ≙ Rezeptorbindungsstellen)

Kontrollgruppen:

	30. Tag	45. Tag
R/mg Prostata	0,967 fmol/mg	0,677 fmol/mg
R/Einzelprostata	-	-
R/mg DNA	279,143 fmol/mg	273,983 fmol/mg
R/mg Protein	64,433 fmol/mg	26,370 fmol/mg

CA-Tiere:

	30. Tag	45. Tag
R/mg Prostata	0,500 fmol/mg	0,086 fmol/mg
R/Einzelprostata	10,510 fmol/mg	3,510 fmol/mg
R/mg DNA	135,000 fmol/mg	23,945 fmol/mg
R/mg Protein	34,667 fmol/mg	7,400 fmol/mg

Außerdem ließ sich feststellen, daß die Bindungsstellen der CA-Gruppen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen stark abfallen und zwar um durchschnittlich 31 %.
Die Abnahme der Bindungsstellen von den CA-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigt keine Kontinuität und Gleichmäßigkeit in den entsprechenden Altersgruppen. Es liegt somit keine Gesetzmäßigkeit vor.
Es hat sich deutlich gezeigt, daß die starken Abnahmen der Bindungsstellen unter der CA-Behandlung eine direkte Wirkung des Antiandrogens darstellt. Unklar bleibt nur der genaue Wirkungsmechanismus des CA, da zwei konträre Ergebnisse über seine Wirkung vorliegen:

- CA galt bislang als kompetitiver Hemmer an den Rezeptorbindungsstellen des DHT (Neumann u. Steinbeck (1974); Yates and King (1980)).
- Moeller und Goecke (1983) stellten fest, daß CA die Synthese des Prostataandrogenrezeptors induzieren kann.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Blondeau, J.P., Corpechat, C., le Grascogne, C., Baulieu, E.-E. and Robel, P.: Androgen Receptors in the Rat Ventral Prostate and their hormonal Control
Vit. Horm. 33, 319-345 (1975)

2. Burton, K.: A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleïc acid.
Biochem. j. 62, 315-322 (1956)

3. Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen
6. Auflage
J.R. Geigy, Pharmazeutische Abteilung (1962) s. 32 u. S.40

4. Dorfman,R.J.: Biological Activity of Antiandrogens
Br.J.Derm. 82, Supplement 6, 2-8 (1970)

5. Fang,S., Anderson,K.M. and Liao,S.:
Receptor proteins for androgens an the role of specific proteins in retention of 17β-hydroxy-5-androstane-3-one by the rat ventral prostate in vivo and in vitro.
J. biol. chem. 244, 6584 (1969)

6. Fang,S. Liao,S.: Antagonistic action of antiandrogens on the formation of a specific dihydrotestosterone receptor protein complex in rat ventral prostate.
Mol. Pharmacol. 5, 428-431 (1969)

7. Gaubert,C.M., Tremblay,R.R. and Dubē,J.Y.:
Effect of sodium molybdate on cytosolic androgen receptors in rat prostate.
J.Steroids Biochem. 13, 931-937 (1980)

8. Gupta,D., Rager,K., Zarzycki,J. and Eichner,M. (1974):
Levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism.
J.Endocrinol. 66, 183-193, (1975)

9. Hammerstein,J., Lachnit-Fixson,U., Neumann,F. and Plewig,G.:
Androgenization in women.
Pharmacology of antiandrogens.
Excerpta Medica, Amsterdam 147-155 (1980)
(Symposium Berlin 23rd-24th february 1979)

10. Hughes,A., Jacobsen,H.J., Wagner,R.K. and Jungblut,P.W. (1976):
Ovarian-independant fluctuation of estradiol receptor levels in mammalion tissues.
Mol. cell. Endocrinol. 5, 379-388

11. Junkmann,K. und Neumann,F.: Zum Wirkungsmechanismus von an Foeten antimaskulin wirksamen Gestagenen.
Acta endocr. (Kbh). Suppl. 90, 139 (1964)

12. Karlson,P.: Hormonrezeptoren und Hormonwirkung
Klin.Wschr. 57, 607-612 (1979)

13. Lander,K.: Dissertation Tübingen (in Vorbereitung)

14. Mainwaring,W.J.P.: A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate.
J.Endocrinol. 45, 531 (1969)

15. Menon,M., Tananis,C.E., Hicks,L.L., Hawkins,E.F., Mc Loughlin, M.G. and Walsh,P.C.: Characterization of the binding of a potent synthetic androgen, methyltrienolone-one, to human tissue,
J.Clin.Jnvest, 61, 150-162 (1978)

16. Moeller,H.: Bestimmung von Androgenrezeptoren durch Bindung von ^{3}H-Dihydrotestosteron in Gegenwart von NAD$^{\pm}$-Nukleosidase.
(Habilitationsschrift, Tübingen)
Attempto, Tübingen (1982)

17. Moeller,H. und Gupta,D.: Zur Rolle von Hypo- und Epiphyse bei der Regulation des Androgenrezeptors.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.: 364, 353-354 (1983)

18. Moeller,H., Goecke,B. und Gupta,D.: Modulation of prostatic androgen receptors due to cyproterone acetate.
Acta Endocrinol. (Copenh.) 102, 153-160 (1983)

19. Moeller,H., Lander,K., Mates,G. und Gupta,D.:
Prostatic concentrations of androgens and androgen-receptors in developing rats.
Ped. research 15, 1565 (1981)

20. Moeller,H., Oettling,G., Fiederer,B. and Brügmann,G.:
A quantitative assay for the cytoplasmic androgen receptor using ^{3}H-dihydrotestosterone in the presence of NAD$^{\pm}$ nucleosidase
Acta Endocrinol. 102, 153-160 (1983)

21. Moeller,H., Oettling,G., Fiederer,B. and Gupta,D. (1980):
5α-dihydrotestosterone-receptor estimation through ^{3}H-5α-dihydrotestosterone exchange.
J.clin. chem. clin. biochem. 18, 726

22. Negro-Vilar,A., Krulich,L. and Mc Cann,S.M.:
Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat.
Endocrinology 93, 660-664 (1973)

23. Neumann,F., Richter,K.-D. und Günzel,P.:
Wirkungen von Antiandrogenen
Zbl. Vet.-Med. Reihe A, 12, 171 (1965)

24. Neumann,F. und Steinbeck,H.:
Handbook of Experimental Pharmacology.
Antiandrogens which do not affect endogenous androgen biosynthesis markedly: Cyproterone Acetate
Springer Verlag, Berlin (1974), Vol. 35/2, 246-255

25. Oettling,G.: Dissertation, Tübingen (in Vorbereitung)

26. Schaffner,W. and Weissmann,C.:
A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution.
Anal. Biochem. 56, 502-514 (1973)

27. Snochowski,M., Poussette,A., Ekman,P., Bression,D., Andersson, L., Högberg,B. and Gustafsson,J.-A.:
Characterization and measurement of the androgen receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma.
J.Clin.Endocrinol. Metab. 45, 920-930 (1977)

28. Stützle,H.: Periphere Hormone und ihre Beziehung zum Wachstum bei der männlichen Ratte
Dissertation, Tübingen (1983)

29. Unhjem,O. and Tveter,U.J.: Localisation of an androgen binding substance from the rat ventral prostate.
Acta Endocrin,(Kbh) 60, 571-578 (1969)

30. Wagner,R.K.: Characterization and assay of steroid hormone receptors and steroid binding serum proteins by agar gel electrophoresis at low temperature.
Hoppe-Seyler's Z.physiol. chem. 353, 1235-1245 (1972)

31. Wagner,R.K.: Extracellular and intracellular steroid binding proteins.
Acta Endocrinol. Suppl. 218 (1978)

32. Yates,J. and King,R.J.B. (1980):
Antiandrogen effects of androgen-responsive mammary tumour cells in culture.
J. of Steroid Biochem. 14, 819-822 (1981)

LEBENSLAUF

Am 6. April 1958 wurde ich, Susanne Kandel, als Tochter des Bau-Ingenieurs Richard Josef Kandel und seiner Ehefrau Maria Theresia Kandel geb. Schänzle, in Ulm/Donau geboren.
Vom Frühjahr 1965 bis Herbst 1968 besuchte ich die Grundschule in Ehingen/Donau. Im September 1968 wechselte ich auf das städtische Gymnasium in Ehingen/Donau über, wo ich am 17. Mai 1977 das Zeugnis der Reife erwarb.

Im Oktober 1977 nahm ich das Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen auf.
Im Oktober 1978 legte ich dort die naturwissenschaftliche und im März 1980 die zahnärztliche Vorprüfung ab.
Das zahnärztliche Staatsexamen bestand ich am 15. Dezember 1982.

Seit April 1983 bin ich in der freien Praxis als Assistentin tätig.